

頭蓋咽頭腫の各タイプにおける遺伝子異常

吉本勝彦、岩田武男、水澤典子

徳島大学大学院医歯薬学研究部分子薬理学分野

山田正三

虎の門病院内分泌センター間脳下垂体外科

井下尚子

虎の門病院病理部

はじめに

頭蓋咽頭腫は、胎生期の頭蓋咽頭管内の遺残上皮が腫瘍化したトルコ鞍部の良性上皮性腫瘍である。頭蓋咽頭腫は、小児に多く術後に再発しやすい「エナメル上皮腫型」と、発症年齢が比較的高く第三脳室に進展するものが多い「扁平上皮乳頭型」の二つのタイプに分類される。まれに、二つのタイプの「混在型」および「絨毛化型（cilia や goblet 細胞を認める扁平上皮乳頭型）」が認められる。

これまでに「エナメル上皮腫型」では β -カテニン¹⁾、「扁平上皮乳頭型」では BRAF (V600E) の活性化変異²⁾ が明らかにされているが、「混在型」および「絨毛化型」の腫瘍化機構は不明である。

本研究は、頭蓋咽頭腫の各タイプにおける遺伝子変異を検討することにより、腫瘍化機構の解明を目的とする。

研究方法

1. 「エナメル上皮腫型」「扁平上皮乳頭型」および「絨毛化型」の遺伝子変異解析

頭蓋咽頭腫の凍結組織からゲノム DNA を常法により抽出し、 β -カテニン (CTNNB1) 遺伝子エクソン 3 の変異、および BRAF 遺伝子エクソン 15 内のコドン 600 変異について直接塩基配列決定法により検討した。CTNNB1 変異検出用 PCR プライマーの塩基配列は、5'-ctgcagcatcttcattccaa-3' および 5'-tgatttttgtgaatactgggaac-3' で、BRAF 変異検出用 PCR プライマーの塩基配列は 5'-tactgaattggggtctgct-3' および 5'-tgtcagttcagggttgacac-3' である。PCR 産物を ExoSAP-IT (USB Corporation) で処理後、ABI 3500xL sequencing analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。

変異陽性細胞の割合が少ない腫瘍においては、直接塩基配列決定法では変異を検出できない可能性がある。直接塩基配列決定法で BRAF 変異陰性であった腫瘍においては、高感度で 1% 程度の変異アレルを検出可能である Competitive Allele-Specific TaqMan[®] PCR (castPCR) (TaqMan[®] Mutation Detection, BRAFc.1799T>A/p.V600E 検出用, Applied Biosystems) の添付プロトコールに従い変異解析を行った。

2. 頭蓋咽頭腫のマイクロアレイ解析

「エナメル上皮型」(CTNNB1 変異なし 1 例および CTNNB1 変異 (c.121A>G (T41A)) 1 例)、「扁平上皮乳頭型」(BRAF 変異 (c.1799T>A (V600E)) 1 例)、「エナメル上皮型・扁平上皮乳頭型の混合型」(変異未検出) 1 例の計 4 例の腫瘍組織から ISOGEN (Nippon gene) を用いて total RNA を抽出し、Whole Human Genome DNA マイクロアレイ 4 x 44K (Agilent) を用いたマイクロアレイ解析を徳島大学医学部総合研究支援センターに委託した。得られたデータを Gene Spring GX10 (トミーデジタルバイオロジー) により解析した。

結果

1. 「エナメル上皮腫型」「扁平上皮乳頭型」および「絨毛化型」の遺伝子変異

直接塩基配列決定法で、「エナメル上皮腫型」42 例のうち CTNNB1 変異 (p.D32Y, p.D32N, p.S33F, p.S33C, p.G34E, p.T41A, p.T41I, p.T41A, p.S45P, p.S45F) を 13 例に、「扁平上皮乳頭型」17 例のうち BRAF 変異を 12 例に認めた。直接塩基配列決定法で BRAF 変異を検出されなかった「扁平上皮乳頭型」4 例において、castPCR により変異を確認した。「絨毛化型」5 例ではいずれの変異も検出しなかった。「エナメル上皮腫型」優位の混在型 6 例では CTNNB1 変異 2 例、BRAF 変異 1 例、変異未検出 3 例、「扁平上皮乳頭型」優位 1 例では変異未検出、「エナメル上皮腫型」「扁平上皮乳頭型」同程度の混在 2 例では BRAF 変異 1 例、変異未検出 1 例、「絨毛化型」と「扁平上皮乳頭型」の混在型 2 例では変異未検出と、「混在型」の 6 例 (60%) にはどちらの変異も認めなかった。「エナメル上皮腫型」と「扁平上皮乳頭型」の混在型では、1 個の腫瘍で CTNNB1 と BRAF の変異が共存する可能性が高いと予想したが、1 種のみの変異検出あるいは 2 種ともに変異が検出されなかった。

2. マイクロアレイ解析

1) マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)

BRAF 変異陽性「扁平上皮乳頭型」(BRAF mut SP) では MMP1、MMP3、MMP10、MMP13 などが、CTNNB1 変異陽性「エナメル上皮型」(CTNNB1 mut AD)、CTNNB1 変異陰性「エナメル上皮型」(wt AD)、CTNNB1・BRAF 変異陰性「混在型」に比べ、高レベルを示した。

2) ケラチン

CTNNB1 mut AD では KRT5、KRT13、KRT16 が wt AD に比して高レベルを示した。

3) クローディン 1 (CLDN1)

CTNNB1 mut AD および wt AD では、CLDN1 が BRAF mut SP および CTNNB1・BRAF 変異陰性混在型に比して低レベルを示した。

考察

歯原性上皮への分化が認められる「エナメル上皮腫型」では CTNNB1 遺伝子に¹⁾、口腔粘膜への分化が認められる「扁平上皮乳頭型」では BRAF 遺伝子に²⁾、それぞれのドライバー変異が見いだされている。CTNNB1 のエクソン 3 にはセリンあるいはスレオニン残基に富む部分があり、この部

位の glycogen synthase kinase-3 β や casein kinase1 α によるリン酸化が β -カテニタンパク分解に重要な役割を果たしている。これらのリン酸化部位に変異を生じた β -カテニタンパクはユビキチン化とプロテアソームによる分解を受けなくなり、核に移行して細胞増殖に関連する遺伝子転写を促進する。一方、BRAF の V600E 変異はメラノーマなど多くの腫瘍で認められる。この変異により BRAF のキナーゼ活性が促進し、その結果 mitogen-activated protein kinase 経路の恒常的活性化がおこり細胞増殖を引き起こすと考えられている。そのため、「扁平上皮乳頭型」において BRAF キナーゼの阻害剤の有用性が検討されはじめている。

「エナメル上皮腫型」での CTNNB1 変異の検出頻度の報告に、16%から 100%と大きな差異がある^{1), 3)-7)}。直接塩基配列決定法では 20%から 30%の変異アレルまでしか検出できないため、この差異は解析した腫瘍組織における変異陽性細胞クラスターの腫瘍内に占める割合の差によるものと考えられる。予備的検討ではあるが、免疫組織化学で β -カテニンの核移行を認めるにもかかわらず CTNNB1 変異が未検出の腫瘍を経験している。また、CTNNB1 変異未検出例における β -カテニンの核への移行は、Wnt シグナルを活性化する他の genetic または epigenetic event の関与も推測されている。

一方「扁平上皮乳頭型」における BRAF 変異は、81%から 100%と高頻度に検出されとの報告がある^{1), 8), 9)}。このうち英国のグループは、「エナメル上皮腫型」の一部に CTNNB1 および BRAF 変異の共存を報告しているが⁸⁾、我々の検討した腫瘍においては混在型も含めて両遺伝子に変異が認められる腫瘍は認められない。

「絨毛化型」は扁平上皮化生を伴ったラトケ嚢胞との鑑別が問題となる。両者には形態上明らかなオーバーラップがみられることより、「絨毛化型」はラトケ嚢胞の基底細胞に由来する腫瘍とも考えられている¹⁰⁾。「絨毛化型」では CTNNB1、BRAF いずれの変異も認めなかった。一部の検体の免疫組織化学では β -カテニンの核移行を認めず、BRAF (V600E) も絨毛にのみ陽性所見を認めた。

CTNNB1 変異陽性細胞がクラスターのみに限局する理由として、そこから傍分泌で成長因子を分泌して変異陰性細胞を増殖させているとの仮説がある。このため予備的にマイクロアレイによる発現解析を行ったが、CTNNB1 変異陽性腫瘍における β -カテニン下流の標的遺伝子や分泌性の成長因子の発現の差異は認めなかった。マトリックスメタロプロテアーゼやケラチンに組織型あるいは変異特異的な発現パターンを認めた。またエナメル上皮腫型では CLDN1 の発現が低下しており、浸潤性との関連が推定されている¹¹⁾。

文献

1. Sekine S, Shibata T, Kokubu A, Morishita Y, Noguchi M, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Craniopharyngiomas of adamantinomatous type harbor β -catenin gene mutations. Am J Pathol. 2002;161:1997-2001.

2. Brastianos PK, Taylor-Weiner A, Manley PE, Jones RT, Dias-Santagata D, Thorner AR, Lawrence MS, Rodriguez FJ, Bernardo LA, Schubert L, Sunkavalli A, Shillingford N, Calicchio ML, Lidov HG, Taha H, Martinez-Lage M, Santi M, Storm PB, Lee JY, Palmer JN, Adappa ND, Scott RM, Dunn IF, Laws ER Jr, Stewart C, Ligon KL, Hoang MP, Van Hummelen P, Hahn WC, Louis DN, Resnick AC, Kieran MW, Getz G, Santagata S. Exome sequencing identifies BRAF mutations in papillary craniopharyngiomas. *Nat Genet.* 2014;46:161-165.
3. Campanini ML, Colli LM, Paixao BM, Cabral TP, Amaral FC, Machado HR, Neder LS, Saggioro F, Moreira AC, Antonini SR, de Castro M. CTNNB1 gene mutations, pituitary transcription factors, and microRNA expression involvement in the pathogenesis of adamantinomatous craniopharyngiomas. *Horm Cancer.* 2010;1:187-196.
4. Hölsken A, Kreutzer J, Hofmann BM, Hans V, Oppel F, Buchfelder M, Fahlbusch R, Blümcke I, Buslei R. Target gene activation of the Wnt signaling pathway in nuclear β -catenin accumulating cells of adamantinomatous craniopharyngiomas. *Brain Pathol.* 2009;19:357-364.
5. Oikonomou E, Barreto DC, Soares B, De Marco L, Buchfelder M, Adams EF. β -catenin mutations in craniopharyngiomas and pituitary adenomas. *J Neurooncol.* 2005;73:205-209.
6. Buslei R, Nolde M, Hofmann B, Meissner S, Eyupoglu IY, Siebzehnriibl F, Hahnen E, Kreutzer J, Fahlbusch R. Common mutations of β -catenin in adamantinomatous craniopharyngiomas but not in other tumours originating from the sellar region. *Acta Neuropathol.* 2005;109:589-597.
7. Kato K, Nakatani Y, Kanno H, Inayama Y, Ijiri R, Nagahara N, Miyake T, Tanaka M, Ito Y, Aida N, Tachibana K, Sekido K, Tanaka Y. Possible linkage between specific histological structures and aberrant reactivation of the Wnt pathway in adamantinomatous craniopharyngioma. *J Pathol.* 2004;203:814-821.
8. Larkin SJ, Preda V, Karavitaki N, Grossman A, Ansorge O. BRAF V600E mutations are characteristic for papillary craniopharyngioma and may coexist with CTNNB1-mutated adamantinomatous craniopharyngioma. *Acta Neuropathol.* 2014;127:927-929.
9. Schweizer L, Capper D, Hölsken A, Fahlbusch R, Flitsch J, Buchfelder M, Herold-Mende C, von Deimling A, Buslei R. BRAF V600E analysis for the differentiation of papillary Craniopharyngiomas and Rathke's Cleft Cysts. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015;41:733-742.
10. Sato K, Oka H, Utsuki S, Kondo K, Kurata A, Fujii K. Ciliated craniopharyngioma may arise from Rathke cleft cyst. *Clin Neuropathol.* 2006;25:25-28.
11. Stache C, Hölsken A, Fahlbusch R, Flitsch J, Schlaffer SM, Buchfelder M, Buslei R. Tight junction protein claudin-1 is differentially expressed in craniopharyngioma subtypes and indicates invasive tumor growth. *Neuro Oncol.* 2014;16:256-264.